

**FACULTAD DE  
CIENCIAS AGRONÓMICAS  
Y DE LOS ALIMENTOS**



**PONTIFICIA  
UNIVERSIDAD  
CATÓLICA DE  
VALPARAÍSO**

**TALLER DE TÍTULO**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Evolución de los compuestos aromáticos en botella, de un vino  
tinto cv. *Syrah*, producido con diferentes especies  
*Saccharomyces* y no- *Saccharomyces*.**

**FELIPE ESTEBAN MOREL PONCE**

**QUILLOTA, CHILE**

**Abril, 2019.**

## índice

	pag.
Resumen.....	1
Definición del problema.....	2
Hipótesis.....	5
Objetivos.....	6
Estado del arte.....	7
Levaduras vínicas.....	7
<i>S. cerevisiae</i> .....	7
No- <i>Saccharomyces</i> .....	7
Inoculación secuencial.....	8
Envejecimiento.....	9
Materiales y métodos.....	10
Materia vegetal.....	10
Microvinificación, tratamientos y muestro.....	10
Análisis químico.....	12
Análisis sensorial.....	12
Entrenamiento del panel.....	12
Análisis sensorial descriptivo.....	13
Análisis estadístico.....	14
Bibliografía.....	14
Plan de trabajo.....	16
Resultados esperados.....	18
Organización: cargos y funciones.....	19
Presupuesto.....	20
Anexos.....	22

## **Resumen**

El uso de fermentaciones mixtas entre levaduras *Saccharomyces* y no- *Saccharomyces* ha ido ganando cada vez más atención en los últimos años debido a la producción de metabolitos de interés enológico, como los aromas. Este trabajo se basa en estudiar la composición volátil de vinos de la variedad Syrah, fermentados con levaduras diferentes y que han pasado por un envejecimiento de dos años en botella. Existen cuatro tratamientos, uno con cultivo puro de *S. cerevisiae*, y los otros tres con una mezcla entre *S. cerevisiae* y levaduras no- *Saccharomyces* (*Torulaspota delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima*). En los tratamientos que utilizan fermentaciones mixtas, la inoculación de *S. cerevisiae* será después de 48 horas de haber inoculado las levaduras no- *Saccharomyces*.

Se estudiará la composición química de cada vino analizando los parámetros básicos (grado alcohólico, pH, acidez volátil, etc.), además de analizar el contenido de fenoles totales, antocianos totales e intensidad del color. La composición volátil de los vinos se medirá utilizando un Cromatógrafo de Gases con Espectrometría de Masas (GC-MS), que permite la identificación de los componentes aromáticos en la muestra de vino. Además, un panel sensorial que será previamente entrenado, analizará las características organolépticas de cada vino, mediante un análisis sensorial descriptivo.

Se espera obtener una mayor concentración de compuestos aromáticos, en vinos elaborados con fermentaciones mixtas, ya que una de las características principales de las no- *Saccharomyces* es presentar una mayor cantidad de enzimas, permitiendo una mayor liberación de aromas al romper diversos enlaces químicos que lo unían a otros compuestos, en donde no eran odoríferos.

### ***Definición del problema u oportunidad***

La industria del vino ha sido durante décadas un referente de nuestro país, de nuestra gente y nuestra geografía. Su calidad y estilo único, lo han llevado a diversos mercados y millones de consumidores dentro del planeta, lo que nos convierte en la actualidad en el octavo productor y cuarto exportador a nivel mundial (Odepa, 2017).

Una característica única y privilegiada de Chile es la capacidad que tiene para producir una amplia gama de variedades de vinos de alta calidad, en cuanto a cepas y estilos, como resultado de una diversidad geográfica, de climas y suelos privilegiados dentro de lo que es el mundo vitivinícola, perfectos para producir uvas sanas y de calidad (Winesofchile, 2018).

Dejando de lado las cepas tradicionales que dominan el sector vitivinícola como: *Cabernet Sauvignon*, *Merlot*, *Carmenere*, *Sauvignon Blanc* y *Chardonnay*, otras cepas están marcando una tendencia en Chile, según SAG (2017), la uva destinada a elaboración de vinos de la variedad *Syrah* ha ido en constante aumento, posicionándose actualmente en el quinto lugar los vinos producidos con esta variedad (Figura 1). Consecuentemente, esto además de abrir nuevos mercados, genera un nuevo abanico de posibilidades para poder estudiar diversos factores que afecten su elaboración y con esto la calidad del vino.

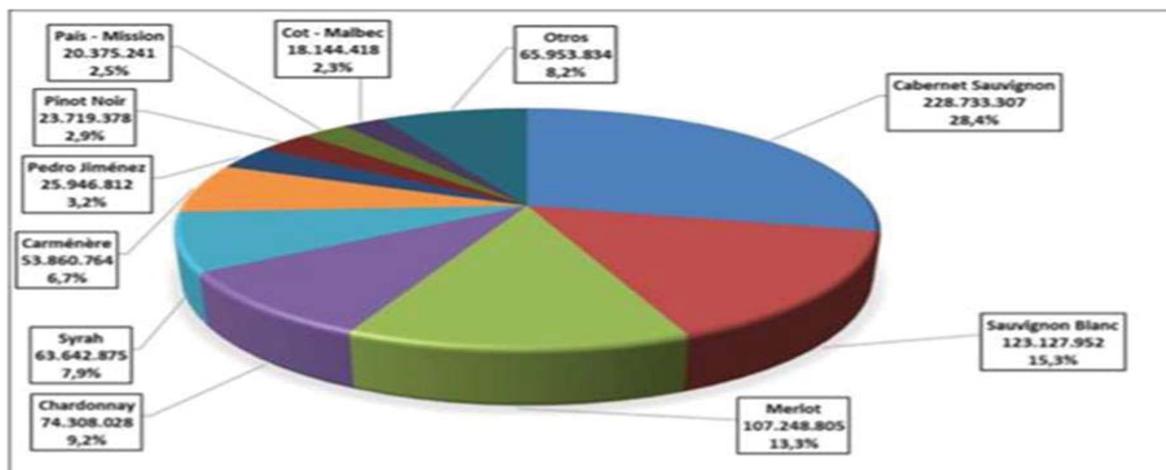


Figura 1.- Gráfico con las principales cepas utilizadas para elaboración de vino en Chile.  
Fuente: SAG, 2017.

Según Winesofchile (2018), el éxito del sector vitivinícola en los últimos 20 años se debe en gran parte al trabajo de investigación y desarrollo tecnológico que han impulsado las viñas, mejorando sus procesos de producción, sus estándares y la calidad. La investigación e innovación representa un elemento que genera una ventaja competitiva.

En este mercado que cada vez es más grande y competitivo, diferenciarnos en alguno de los factores que determinan la calidad de un vino tinto, es indispensable para lograr penetrar en la industria vitivinícola y tener éxito. Se ha experimentado un constante aumento tanto en la cantidad producida como en el precio del vino (Figura 2), lo que refleja lo importante que es esta industria globalmente.

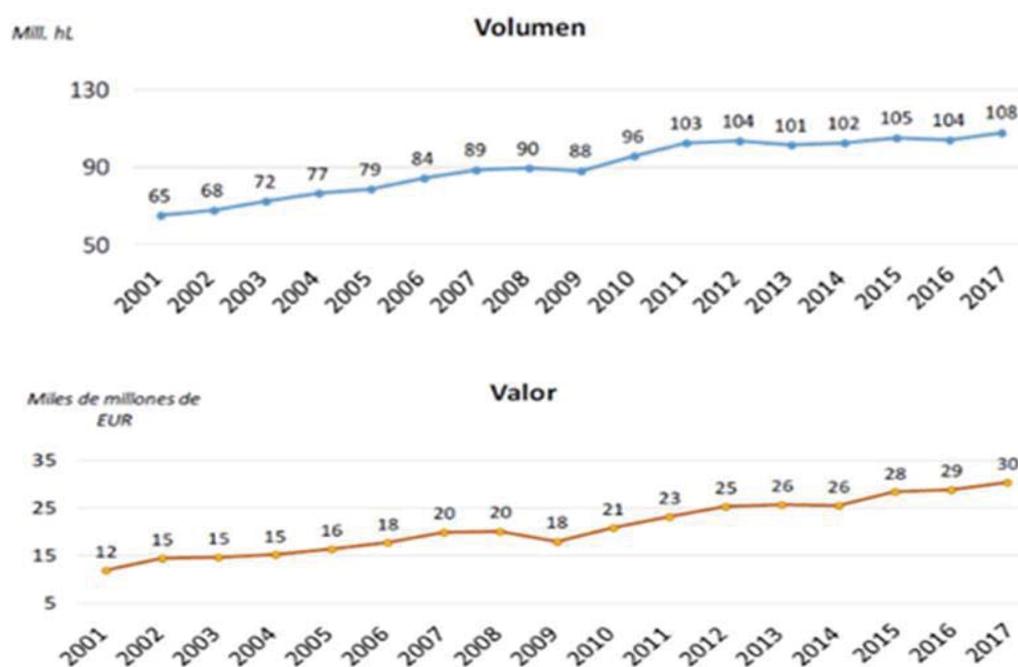


Figura 2.- Evolución de la industria vitivinícola en volumen y precio entre 2001-2017.

Fuente: OIV, 2017.

El aroma es una de las tres características analizadas profundamente al momento de evaluar un vino y determinar su calidad. El impacto olfativo de los compuestos volátiles de un vino depende tanto de su concentración como de su naturaleza (Ribereau-Gayon,

2003). Esta concentración y fundamentalmente su naturaleza están en gran medida controladas por las levaduras que participan en la fermentación alcohólica, proporcionando al vino los llamados aromas secundarios.

La fermentación alcohólica se puede realizar tanto con fermentaciones espontáneas (levaduras autóctonas) o con inoculación del mosto (levaduras comerciales), desafortunadamente una fermentación realizada con levaduras nativas reduce la predictibilidad del proceso y aumenta los riesgos de desviaciones organolépticas. De esta manera el proceso alternativo de inoculación ha ido ganando interés ya que reduce el riesgo de contaminaciones y además genera un ambiente fermentativo mucho más controlado (Sadoudi et al., 2012).

Existe un paradigma sobre la estandarización de los vinos elaborados con inoculación de *S. cerevisiae*, debido a que, estos vinos son más homogéneos durante los años, es decir, un vino más parecido año tras año, independiente de la microbiota autóctona. Esto genera rechazo de enólogos que prefieren la fermentación espontánea, debido a la homogenización del producto, es por esto que las fermentaciones mixtas son la solución para terminar con este problema y generar una gama de posibilidades mucho mayor que una inoculación pura. La comprensión de la naturaleza y el origen de metabolitos volátiles del vino pueden proporcionar el potencial para manipular la ecología de levadura hacia la producción de vinos con sabor, aroma, y características cromáticas deseadas por los grupos de consumidores específicos (Englezos et al., 2018).

Según Sáenz-Navajas (2014), el periodo de almacenamiento en botella es crítico en la cadena de valor del vino, ya que una vez que el vino es embotellado, no hay más opciones para el control de cualquier desviación sensorial. Por lo que cada proceso antes del embotellado debe ser sumamente preciso. Será interesante profundizar en el conocimiento sobre la evolución de los compuestos aromáticos en botella, debido a que comúnmente vemos en las tiendas botellas de vinos de hasta tres años de antigüedad, lo que nos permitirá tener una visión más exacta del tipo de compuestos que se encuentran en estos vinos envejecidos, teniendo en cuenta las diferencias organolépticas provocadas por las diversas especies de levaduras presentes en el proceso.

***Hipótesis***

El vino elaborado con una mezcla entre levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, dará como resultado un vino con una mayor complejidad aromática luego de una guarda de dos años en botella.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Estudiar la composición de los componentes volátiles en vinos de la variedad Syrah, fermentados con diversas inoculaciones de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, luego de una guarda en botella de dos años.

### **Objetivo específico 1**

Identificar los constituyentes aromáticos en vinos obtenidos de las diferentes fermentaciones.

### **Objetivo específico 2**

Analizar los compuestos aromáticos durante una guarda en botella de dos años.

### **Objetivo específico 3**

Determinar la complejidad aromática y características organolépticas de los vinos producidos mediante inoculaciones diversas.

## **Estado del arte**

### **Levaduras vínicas**

#### ***S. cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* se ha utilizado comúnmente en la fermentación del vino debido a su capacidad para inducir una fermentación fiable y rápida, la facilidad de control y consistencia de las fermentaciones (Lee et al., 2012).

Los avances en las distintas áreas como la biotecnología han permitido el aislamiento, selección, caracterización y finalmente la comercialización de una amplia variedad de levaduras con diferentes características: cepas que producen una mayor cantidad de glicerol, cepas que no producen H<sub>2</sub>S, cepas que producen menor concentración de acetaldehído, cepas resistentes a condiciones de fermentación extremas o poco favorables, cepas que favorecen la extracción de determinados aromas, cepas que absorben poco el color, cepas con una elevada liberación de manoproteínas, etc (Morata et al., 2003)

Debido a que las cepas no- *Saccharomyces* no son capaces de consumir altos niveles de azúcar desde el mosto, es que se debe utilizar en combinación con cepas *Saccharomyces*, con el fin de completar la fermentación (Flota, 2008). Según Maturano (2009), los resultados obtenidos en diversas investigaciones alientan al uso potencial de la levadura no- *Saccharomyces* en conjunto con *Saccharomyces* como una herramienta para aumentar la complejidad del vino, ya que condiciones mixtas mostraron mayores valores de actividades enzimáticas, que se asociaron con los principales grupos aromáticos de interés en el vino.

#### **no- *Saccharomyces***

Las investigaciones sobre el potencial aromático de las levaduras no- *Saccharomyces*, junto con la optimización de la producción de estas levaduras en forma seca, permite al

enólogo reproducir de manera controlada la sucesión natural de especies que ocurren en una fermentación espontánea.

La alta producción de glicerol, manoproteínas, ácidos orgánicos que contribuyen a la acidez total, compuestos volátiles con agradables notas y baja producción de ácido acético y etanol, promovieron su utilización en la vinificación (Ciani et al., 2006).

Durante el proceso de fermentación, las levaduras, y sobre todo las cepas no-*Saccharomyces*, producen y secretan una variedad de enzimas, tales como: glucosidasas, proteasas, pectinasas, xilanasas y amilasas (Comitini et al., 2011; Maturano et al., 2012). Estas enzimas pueden interactuar con los precursores de mosto de uva sin olor, para producir compuestos aromáticos que mejoran indudablemente el aroma del vino (Maturano et al., 2015).

### ***Inoculación secuencial***

Según Raynal (2010), estaba ampliamente descrito cómo la sucesión de poblaciones de levaduras, con una alternancia del predominio de levaduras no-*Saccharomcyes* en la primera fase de la fermentación alcohólica y luego de *Saccharomyces*, es fundamental para la complejidad aromática de los vinos. El resultado es una inoculación secuencial que evita que se produzca una competición desmedida entre las cualidades fermentativas y organolépticas de cada una de las especies.

La fermentación secuencial usando dos especies de levaduras emula la fermentación natural (espontánea), en la que varias especies de levaduras de la uva son activas (Loira et al., 2014).

Se ha demostrado en diversos trabajos, como el retraso en la inoculación con *Saccharomyces* (fermentaciones mixtas) afecta en la composición volátil final del vino, como una disminución en las notas herbáceas luego de 24 horas de demora (Sadoudi et al., 2012), un aumento en la concentración de 2- feniletanol (aromas florales) en fermentaciones con un retardo de 48 horas en vinos producidos a partir de uvas Syrah y

Merlot (Zara et al., 2014) y una disminución evidente de la producción de alcoholes superiores cuando la inoculación se retrasó por 48 horas (Englezos et al., 2018).

### ***Envejecimiento***

Según Sáenz-Navajas (2014), el periodo de almacenamiento en botella es crítico en la cadena de valor del vino, ya que una vez que el vino es embotellado, no hay más opciones para el control de cualquier desviación sensorial. Por lo que cada proceso antes del embotellado debe ser sumamente preciso.

En los vinos tintos se han observado incrementos en el color amarillo y la tonalidad, además de una disminución de aromas de frutas frescas y de la astringencia, y un aumento en el sabor amargo (Gómez Gallego et al., 2013).

La evolución de las propiedades sensoriales del vino durante el embotellado se ha demostrado ser dependientes de diversos factores tales como la temperatura de almacenamiento, luminosidad o la exposición del vino a diferentes concentraciones de oxígeno a lo largo del periodo de envejecimiento (Caille et al., 2010).

Según (evolución en botella), el patrón de evolución sensorial depende tanto de las propiedades sensoriales iniciales de los vinos y su contenido polifenólico, por un lado los vinos con bajo contenido fenólico, muestran aumentos en los atributos de frutos secos mientras que un vino con alto contenido polifenólico muestran una disminución en su carácter de madera, que se traducen en un aumento de la fruta y los atributos de especias, por lo tanto un aumento en la complejidad aromática del vino durante el envejecimiento en botella (Sáenz- Navajas et al., 2014).

## ***Materiales y métodos***

Para obtener resultados que permitan cumplir con los objetivos propuestos en esta investigación se necesitará de una serie de actividades que se realicen metodológicamente.

### ***Materia vegetal***

Se utilizará uva del cv. Syrah (*Vitis vinífera L.*) obtenida de la zona de Casablanca. El muestreo de la uva en el campo se realizará en forma completamente al azar. La fecha de cosecha de la uva se basará en el grado de madurez tecnológica y el análisis de la madurez fenólica. Una vez cosechada la fruta, esta será llevada al Laboratorio de Enología de la Escuela de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, en donde se utilizará el mismo protocolo de microvinificación para todos los tratamientos de este ensayo y solo diferirá en el tipo de levadura utilizada.

### ***Microvinificación, tratamientos y muestreo***

La uva será despalillada y molida mediante una despalilladora-moledora (Eno 3, Enoitalia) antes de ir a los tanques de fermentación. Para eliminar la microbiota autóctona, se utilizará una dosificación de anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>), en forma de metabisulfito de potasio, antes de la fermentación en una dosis de 20 mg/L de SO<sub>2</sub> libre. Se determinará el YAN y en caso de ser necesario se utilizará el producto comercial Fermmaid (Lallemand) como suplemento nitrogenado. Posteriormente se adicionará la levadura respectiva dependiendo del tratamiento. Las fermentaciones se llevarán a cabo en recipientes de plástico de uso alimentario con un volumen de 25 L, para obtener la cantidad suficiente de vino que permita analizar por cada unidad muestral una cantidad determinada de botellas. Se chequeará densidad y temperatura diariamente para llevar un seguimiento de las fermentaciones. La temperatura de fermentación será entre 24-25°C. Se realizará un pisoneo de la uva dos veces al día para extracción de compuestos fenólicos (color y cuerpo del vino). La fermentación alcohólica llegará a su fin una vez que la concentración de azúcar residual sea menor a 2 g/L. Posterior a esto se adicionarán bacterias lácticas

para realizar la fermentación maloláctica (FML). La FML finalizará cuando la concentración de ácido málico sea menor a 0,2 g/L. Posteriormente, los vinos se estabilizarán en frío por 5 días, se ajustará el nivel de SO<sub>2</sub> libre a 25 mg/L y se embotellaran en botellas de vidrio de color ámbar de una capacidad de 750 ml. Para los posteriores análisis, estas botellas serán almacenadas en un ambiente fresco, oscuro y con una temperatura de 15°C.

Las levaduras comerciales que se van a utilizar para inocular el mosto de uva son: *Saccharomyces cerevisiae* (nombre comercial Enoferm), *Torulaspora delbrueckii* (nombre comercial Level 2 Solution Biodiva™) y *Metschnikowia pulcherrima* (nombre comercial Level 2 Solution Flavia™) (Lallemand, 2018).

Existirán 4 protocolos de inoculación (tratamientos) que se encuentran descritos en el Cuadro 1.

Tratamiento	Protocolo de inoculación	Dosificación
1	<i>S. cerevisiae</i>	20 g/hl (Enoferm Syrah)
2	<i>S. cerevisiae</i> / <i>T. delbrueckii</i>	10 g/hl (Enoferm Syrah) + 10 g/hl (Level 2 Solution Biodiva)
3	<i>S. cerevisiae</i> / <i>M. pulcherrima</i>	10 g/hl (Enoferm Syrah) + 10 g/hl (Level 2 Solution Flavia)
4	<i>S. cerevisiae</i> / <i>T. delbrueckii</i> / <i>M. pulcherrima</i>	10 g/hl (Enoferm Syrah) + 5 g/hl (Level 2 Solution Biodiva) + 5 g/hl (Level 2 Solution Flavia)

**Cuadro 1.** Tratamientos de fermentación.

Fuente: Elaboración propia.

Se utilizarán tres repeticiones por tratamientos, en la cual cada repetición corresponderá a un depósito de fermentación de 25 L de capacidad.

Los muestreos para el análisis químico de las muestras, se realizarán en las siguientes etapas:

1° muestreo: al término de la fermentación alcohólica (< 2 g/L de azúcar residual), (tiempo 0)

Los muestreos sucesivos serán cada dos meses hasta completar un período de 24 meses de estudio

### ***Análisis químico del vino***

El grado alcohólico se determinará mediante aerometría, se medirá el pH del vino mediante potenciometría, el contenido de azúcares reductores se evaluará con el método de Fehling, la acidez volátil se medirá a través de la alcalimetría (SAG, 2005) y el contenido de sulfuroso libre y total se establecerá por aspiración según la metodología de la OIV (OIV, 2018).

El contenido de fenoles totales se determinará por absorbancia a D.O de 280 nm utilizando ácido gálico como estándar (Glories, 1984). La concentración de taninos totales se determinará utilizando metilcelulosa como agente precipitante (Sarneckis et al., 2006). La intensidad del color se determinará mediante el método descrito por Glories (1984). El contenido de antocianos totales se obtendrá con el método descrito por Zamora (2003). La concentración total de YAN se determinará espectrofotométricamente mediante el uso de kits enzimáticos.

El análisis de los compuestos volátiles se realizará mediante cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS) según la metodología descrita en Talaverano et al. (2018). La cromatografía de gases es una técnica muy útil para de separación y determinación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles que sean térmicamente estables. Acoplada a la espectrometría de masas, permite una identificación inequívoca de los distintos componentes separados sin necesidad de disponer de patrones de los mismos. En caso de poder comparar con los correspondientes patrones, se puede llevar a cabo, además, el análisis cuantitativo de los compuestos identificados (López et al., 2002).

### ***Análisis sensorial***

#### ***Entrenamiento del panel***

Los panelistas recibirán un entrenamiento sensorial en 8 sesiones (alrededor de una hora por sesión) durante un periodo de 8 semanas. Los vinos seleccionados para la fase de formación general presentarán intensas y fácilmente reconocibles aromas, color y propiedades sensitivas. Los panelistas en formación se familiarizarán con el tipo de muestras del estudio.

Durante la sesión de entrenamiento los panelistas se familiarizarán con los descriptores aromáticos del vino cv. Syrah y con la calificación de los 7 atributos evaluados: intensidad de color, aromas a frutilla, aromas a pimienta negra, aroma a flores (rosas), astringencia, cuerpo y persistencia. De acuerdo con lo propuesto por Cáceres-Mella (2018), los atributos serán evaluados en una escala no estructurada de quince puntos (\*0 = ausencia y \*15 = extremadamente alto).

### ***Análisis sensorial descriptivo***

El análisis sensorial de los vinos se realizará cada dos meses, posterior a la embotellación de las muestras hasta completar el período de estudio de 24 meses en total. Se procederá a la caracterización sensorial por un panel entrenado mediante un análisis descriptivo de las muestras. Se realizarán estas pruebas para evaluar las diferencias sensoriales entre las muestras que se fermentaron con inoculaciones de levaduras distintas y diferencias entre características específicas de cada vino.

Las muestras de vinos serán denominadas con códigos aleatorios de 3 dígitos y con un diseño completamente al azar, se presentarán a un total de 12 panelistas entrenados (21-40 años). Muestras de vino de 20 ml se sirven en copas estandarizadas. Se pedirá a los participantes degustar y tomar nota de las diferentes muestras, basándose tanto en el aroma, color y propiedades en la boca. Entre cada prueba se pedirá a los panelistas enjuagar la boca con agua o galletas sin sal y tendrán un período de descanso de 60 s para disminuir la fatiga sensorial. El análisis descriptivo se realizará en dos sesiones para obtener dos réplicas del panel (Cáceres-Mella et al., 2018).

### **Análisis estadístico**

Se utilizará un diseño experimental completamente al azar. Para los parámetros químicos, el análisis de varianza (ANOVA) se utilizará para la separación media con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0,05$ ). Para el análisis sensorial descriptivo, se utilizaron las pruebas de ANOVA y LSD (Least Significant Difference) con un nivel de significancia del 90% ( $p < 0,1$ ). El análisis de los componentes principales (PCA) se llevó a cabo para observar la distribución de los tratamientos, dependiendo de la composición aromática de estos vinos (Cáceres-Mella et al., 2018; Talaverano et al., 2018)

### **Bibliografía**

- Cáceres-Mella, A., et al. (2018). Controlled water deficit modifies the phenolic composition and sensory properties in Cabernet Sauvignon wines. *Scientia Horticulturae*, 237, 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.008>
- Caille, S., Samson, A., Wirth, J., Dieval, J. -B., Vidal, S., y Cheynier, V. (2010). Características sensoriales de vinos de Garnacha rojos sometidos a diferentes exposiciones de oxígeno pre y post embotellado. *Analytica Chimica Acta*, 660 ( 1 - 2), 35 - 42.
- Ciani M, Beco L, Comitini F (2006) Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int J Food Microbiol* 108:239–245
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., et al. (2011). Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28, 873e882.
- Englezos, V., et al. (2018). Volatile profiles and chromatic characteristics of red wines produced with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 109 (1), 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.027>.
- Flota, GH (2008). Levaduras del vino para el futuro. *Investigación de levadura FEMS*, 8, 979 - 995.
- Glories, Y., 1984. La couleur des vins rouges, 2eme Partier. *Mesure, origine et interpretation. Connaiss. Vigne Vin*. 18, 253–271.
- Gómez Gallego, MA, Gómez García-Carpintero, E., Sánchez-Palomo, E., González Viñas, MA, y Hermosín-Gutiérrez, I. (2013). Evolución del contenido fenólico, características cromáticas y propiedades sensoriales durante el almacenamiento botella de vinos de solo cultivares rojos de la región de Castilla La Mancha. *Food Research International*, 51 ( 2), 554 - 563.
- Lee PR, Hui S, Kho C, Yu B, Curran P, Liu SQ (2012) Yeast ratio is a critical factor for sequential fermentation of papaya wine by *Williopsis saturnus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnol* 6:385–393

- Loira, I., et al. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Science and Technology*, 1(1), 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>
- López, R., et al. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, 966, 167-177. PI I: S0021-9673 (02) 00696-9.
- Maturano YP, Nally MC, Toro ME, Castellanos de Figueroa L, Vazquez F (2009a) Estudio cualitativo de actividades enzimáticas y fenómeno killer en levaduras vínicas. *Revista de Enología* 1:1–11
- Maturano YP, Rodríguez Assaf LA, Toro ME, Nally MC, Vallejo M, Castellanos de Figueroa L, Combina M, Vazquez F (2012) Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int J Food Microbiol* 155:43–50
- Maturano, Y., et al. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 1239-1256. 10.1007/s10482-015-0578-0.
- Morata, A., Gomez-Cordoves, M. C., Colomo, B., & Suarez, J. A. (2003). Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with vitisin A and B formation in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6475e6481.
- ODEPA (2017). Vinos. Recuperado de: <https://www.odepa.gob.cl/rubros/vinos-y-alcoholes>.
- OIV. (2017). Base de datos y estadísticas. Recuperado de <http://www.oiv.int/es/bases-de-datos-y-estadisticas>.
- Raynal, C., et al. (2010). Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-*Saccharomyces* y de una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una herramienta innovadora para el enólogo. Recuperado de: [http://www.enoreports.com/enoreports/pdf/lallemand\\_jul10.pdf](http://www.enoreports.com/enoreports/pdf/lallemand_jul10.pdf).
- Ribéreau Gayon, P., et al. (2003). Tratado de enología: Microbiología del vino – Vinificaciones. (1° ed.). Buenos Aires, Argentina: Mundi Prensa.
- Ribéreau Gayon, P., et al. (2003). Tratado de enología: Química del vino, estabilización y tratamientos. (1ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Mundi Prensa.
- Sadoudi, M., et al. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non- *Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeast. *Food Microbiology*, 32(1), 243-253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>.
- Saez Navaja, M., et al. (2014). Sensory changes during storage of Spanish red wines under different initial oxygen doses. *Food Research International*, 66, 235-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.053>.
- SAG (2005). Instructivo técnico para el análisis de alcoholes, bebidas alcohólicas y vinagres de exportación. Recuperado de: <http://historico.sag.gob.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.aspargCryptedData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hGvT%2FNz0rTy%2B&argModo=inline&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivold=1720>
- SAG. (2017). Producción de vinos 2017. Recuperado de <https://www.sag.cl/content/informe-ejecutivo-produccion-de-vinos-2017>.
- Sarneckis, C., Dambergs, R., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M., Smith, P., 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methylcellulose: development

and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 39–49.

-Talaverano, I., et al. (2017). Water stress and ripeness effects on the volatile composition of Cabernet Sauvignon wines. *J Sci Food Agric*, 98, 1140-1152. DOI 10.1002/jsfa.8565.

- WinesofChile (2018). Objetivos y estrategias. Recuperado de: <http://www.winesofchile.org/es/vinosdechile/objetivos-estrategia>

- Zamora, F. (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. (Primera edición). Madrid, España: Mundi Prensa.

- Zara, G., et al. (2014). mejora de la calidad del vino a través de la utilización combinada de cortezas de levadura y *Candida zemplinina* / *Saccharomyces cerevisiae* cultivos iniciadores mixtos. *Diario Australiano de Investigación del Vino y Uva*, 20, 199 - 207.

### **Plan de trabajo**

El inicio de la cosecha será aproximadamente el 11 de marzo de 2019, indicada por el grado de madurez tecnológica y fenólica, por lo cual la fecha de cosecha puede variar, dos obreros escogerán las uvas de mejor calidad y almacenarán en gamelas para luego ser transportadas en una camioneta hacia el Laboratorio de enología de la PUCV.

Cuando la uva ingrese al laboratorio, se efectuará una limpieza de los racimos para evitar que ingresen hojas, sarmientos u otros elementos a la despalladora – moladora. Luego de la limpieza se procede a despallillar y moler la uva, para posteriormente almacenar el mosto de uva en los tanques de 25 L y dosificar metabisulfito de potasio en una dosis de 20 mg/L de SO<sub>2</sub> libre en cada tanque de fermentación para eliminar la microbiota nativa, todo esto el mismo día de la cosecha (anexo 1).

El día 12 de marzo, se adicionará a cada tanque la levadura no- *Saccharomyces* y *S. cerevisiae* siguiendo los tratamientos indicados en el cuadro 1, para dar inicio a la fermentación alcohólica, a una temperatura de 24- 25 °C. Diariamente se medirá densidad y temperatura para tener un seguimiento de nuestro mosto, además de efectuar dos pisoneos diarios para la extracción de compuestos fenólicos (color y cuerpo del vino). Después de 48 horas se agregará la dosis de levaduras *S. cerevisiae* a cada tanque de fermentación en la dosis propuesta en el cuadro 1.

Una vez finalizada la fermentación alcohólica ( $> 2$  g/L azúcar residual) se procederá al descube y prensado de las partes sólidas, luego al tener el vino limpio almacenado en los tanques se procederá a la adición de bacterias lácticas para comenzar la fermentación maloláctica (anexo 2).

Cuando se termine la fermentación maloláctica ( $< 0,2$  g/L ácido málico) aproximadamente dos semanas después, se añadirá metabisulfito de potasio para estabilizar microbiológicamente el vino, después de esta actividad se comenzará con la estabilización por frío de nuestro vino, la cual tiene un tiempo de duración de cinco días (anexo 3).

Paralelo a las actividades de la microvinificación, dos días a la semana se realizará el entrenamiento del panel sensorial durante ocho semanas, para posteriormente evaluar los vinos obtenidos en cada fermentación (anexo 3).

Después de cinco días de estabilización por frío se separa el vino de los cristales de tartrato. En seguida se dosifica metabisulfito de potasio en una dosis de 20 g/L y el vino es embotellado para su posterior envejecimiento durante dos años, en este momento se extrae una muestra de cada vino y se envía a un laboratorio para analizar mediante GC-MS la composición volátil de estos vinos (anexo 3).

Durante el envejecimiento del vino en la botella se realizarán análisis de composición volátil de cada vino mediante GC-MS cada dos meses a lo largo de dos años, paralelamente se realizará en la misma frecuencia un análisis sensorial con el panel entrenado con anterioridad, para evaluar el aroma de los distintos vinos y sus características organolépticas (anexo 4).

### ***Resultados esperados***

Principalmente como resultado de la ejecución de este proyecto se espera obtener una mayor concentración de compuestos aromáticos en los vinos elaborados con fermentaciones mixtas, debido a la mayor cantidad de enzimas que presentan las levaduras no- *Saccharomyces*, estas enzimas rompen enlaces químicos y con esto hay una mayor liberación de compuestos aromáticos en el vino.

A medida que el envejecimiento en botella sea más prolongado, mayor será la concentración de esteres presentes en el vino, debido a las esterificaciones químicas que se producen en el almacenamiento del vino.

Se pretende obtener vinos de alta calidad, que reflejen el resultado de una fermentación mixta en donde los aromas especiados sobresalgan un poco sobre la fruta, pero sin enmascararla, generando un producto de calidad diferenciado sobre los demás.

Además, se puede esperar que en el tratamiento 4 (cuadro 1), haya una competencia mayor entre *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii*, generando que alguna de las dos afecte el desarrollo de la otra, logrando generar desviaciones organolépticas de aquel vino.

## Organización

**Cargos y funciones (Fondo concursable: FONDEF (CONICYT)).**

Nombre del profesional	Formación/grado académico	Cargo en el proyecto	Funciones (N°)	Costo del personal (MM\$)	Aporte FONDO CONCURSABLE (MM\$)
Felipe Morel Ponce	Ing. Agrónomo	Jefe de proyecto y laboratorio	Planificar, administrar y verificar que las actividades realizadas sean de acorde a lo establecido, está a cargo de los contratos y compras de materiales e insumos necesarios y requeridos. Responsable del proyecto.	\$ 12.144.000	\$ 12.144.000
Tecnico 1	Enólogo	Ayudante de laboratorio	Encargado de las fermentaciones y análisis correspondientes, además de ayudar con el entrenamiento del panel de análisis sensorial.	\$ 352.000	\$ 352.000
Obrero 1	Educación media	Cosechador de uva y ayudante de enólogo	Encargado de cosechar la uva de la mejor calidad. Y ayudar al enólogo en los análisis.	\$ 264.000	\$ 264.000
Obrero 2	Educación media	Cosechador de uva	Responsable de cosechar la uva de mejor calidad y lo más sana posible.	\$ 12.000	\$ 12.000

**presupuesto total**

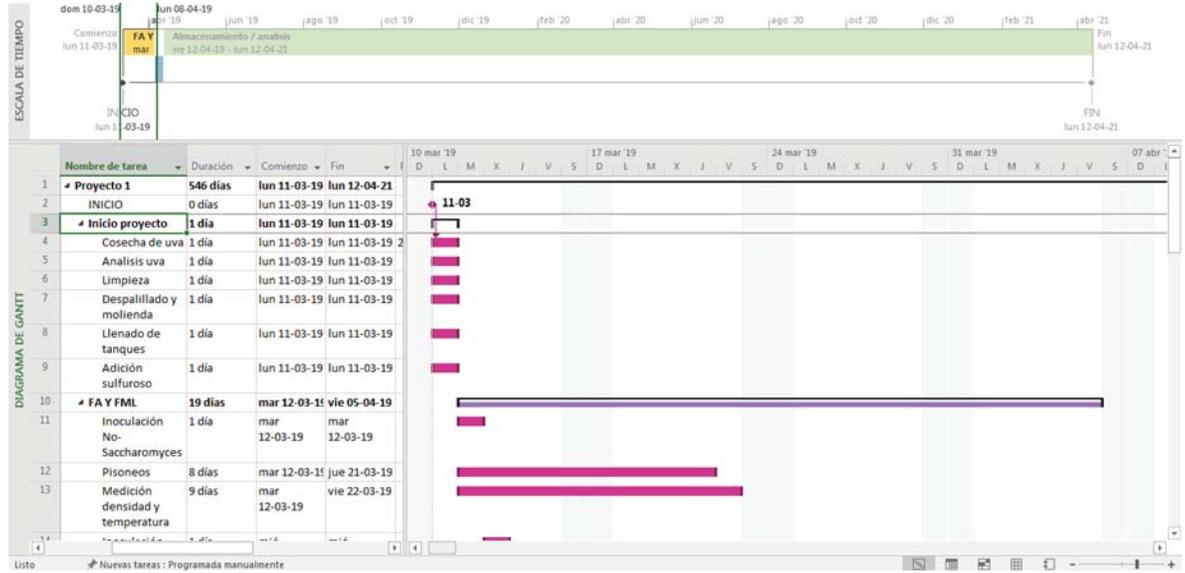
	Cuenta	FONDO CONCURSABLE	APORTE EMPRESA (LALLEMAND)		Total(MM\$)
			Pecuniario	No pecuniario	
A.	Total Recursos Humanos	\$ 12.772.000	x	x	\$ 12.772.000
B.	Total Subcontratos	\$ 1.812.564	\$ 1.717.436	x	\$ 3.530.000
C.	Total Capacitación	\$ 250.000	\$ 250.000	x	\$ 500.000
D.	Total Gastos de Inversión	\$ 428.350	\$ 400.000	x	\$ 828.350
E.	Total Gastos de Operación	\$ 13.916.384	\$ 10.000.000	x	\$ 23.916.384
F.	Total insumos	\$ 227.350	\$ 150.000	x	\$ 377.350
G.	Total materiales	\$ 150.704	\$ 150.000	x	\$ 300.704
H.	Porcentaje de Aporte (%)	70%	30%		100%
<b>TOTAL(MM\$)</b>		<b>\$29.907.351</b>	<b>\$12.667.436</b>		<b>\$ 42.224.788</b>

**Presupuesto total por año**

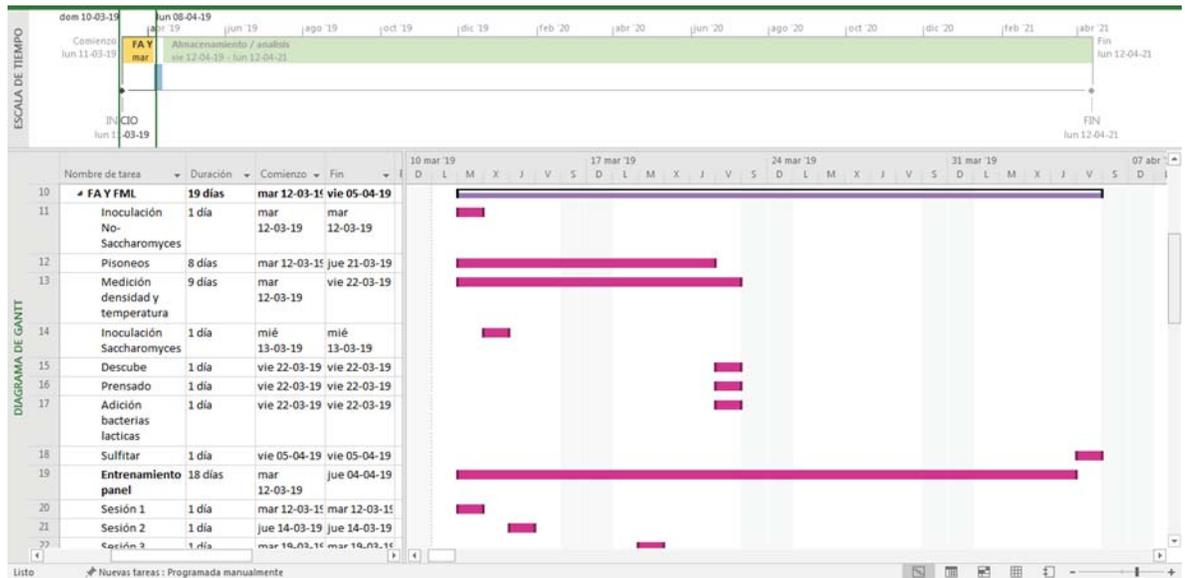
	<b>Cuenta</b>	<b>Año 1</b>	<b>Año 2</b>	<b>Total(MM\$)</b>
A.	Total Recursos Humanos			
	<i>Pecuniario</i>	\$ 6.700.000	\$ 6.072.000	\$ 12.772.000
	<i>No Pecuniario</i>			
B.	Total Subcontratos	\$ 2.090.000	\$ 1.440.000	\$ 650.000
	<i>Pecuniario</i>	x	x	
	<i>No Pecuniario</i>			
C.	Total Capacitación	\$ 500.000	0	\$ 500.000
	<i>Pecuniario</i>	x	x	
	<i>No Pecuniario</i>			
E.	Total insumos	\$ 377.350	0	\$ 377.350
	<i>Pecuniario</i>	x	x	
	<i>No Pecuniario</i>			
F.	Total Gastos de Inversión	\$ 828.350	0	\$ 828.350
	<i>Pecuniario</i>	x	x	
	<i>No Pecuniario</i>			
G.	Total Gastos de Operación	\$ 11.958.192	\$ 11.958.192	\$ 23.916.384
	<i>Pecuniario</i>	x	x	
	<i>No Pecuniario</i>			
H.	Total materiales	\$ 300.704	0	\$ 300.704
	<i>Pecuniario</i>	x	x	
	<i>No Pecuniario</i>			
	<b>Total(MM\$)</b>	<b>\$ 22.754.596</b>	<b>\$ 19.470.192</b>	<b>\$ 42.224.788</b>
	<i>Pecuniario</i>	x	x	
	<i>No Pecuniario</i>			

## Anexos

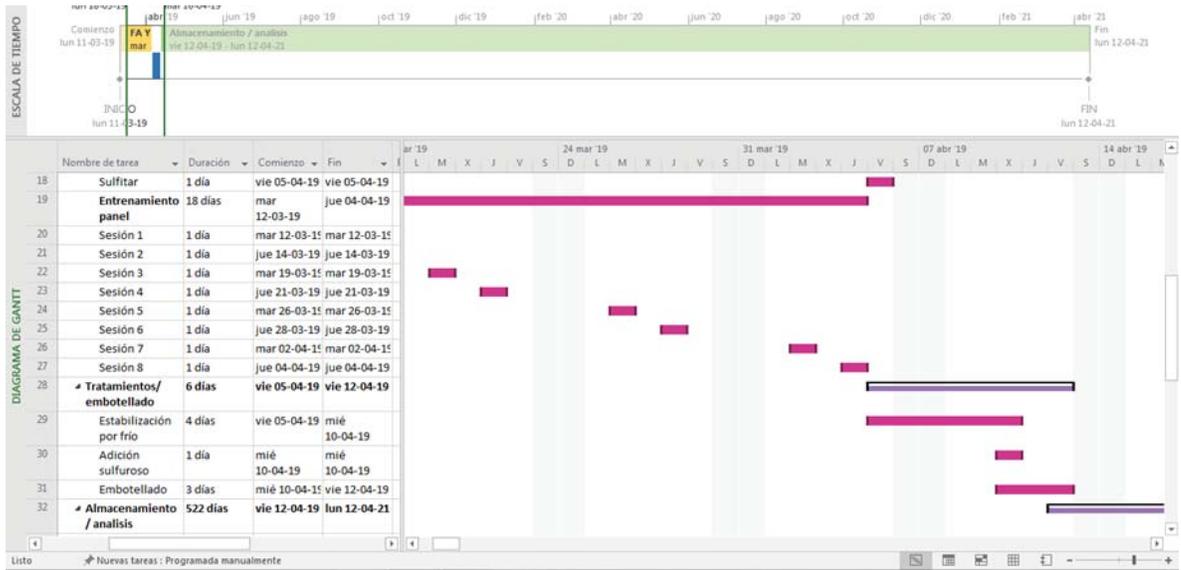
### Anexo 1.



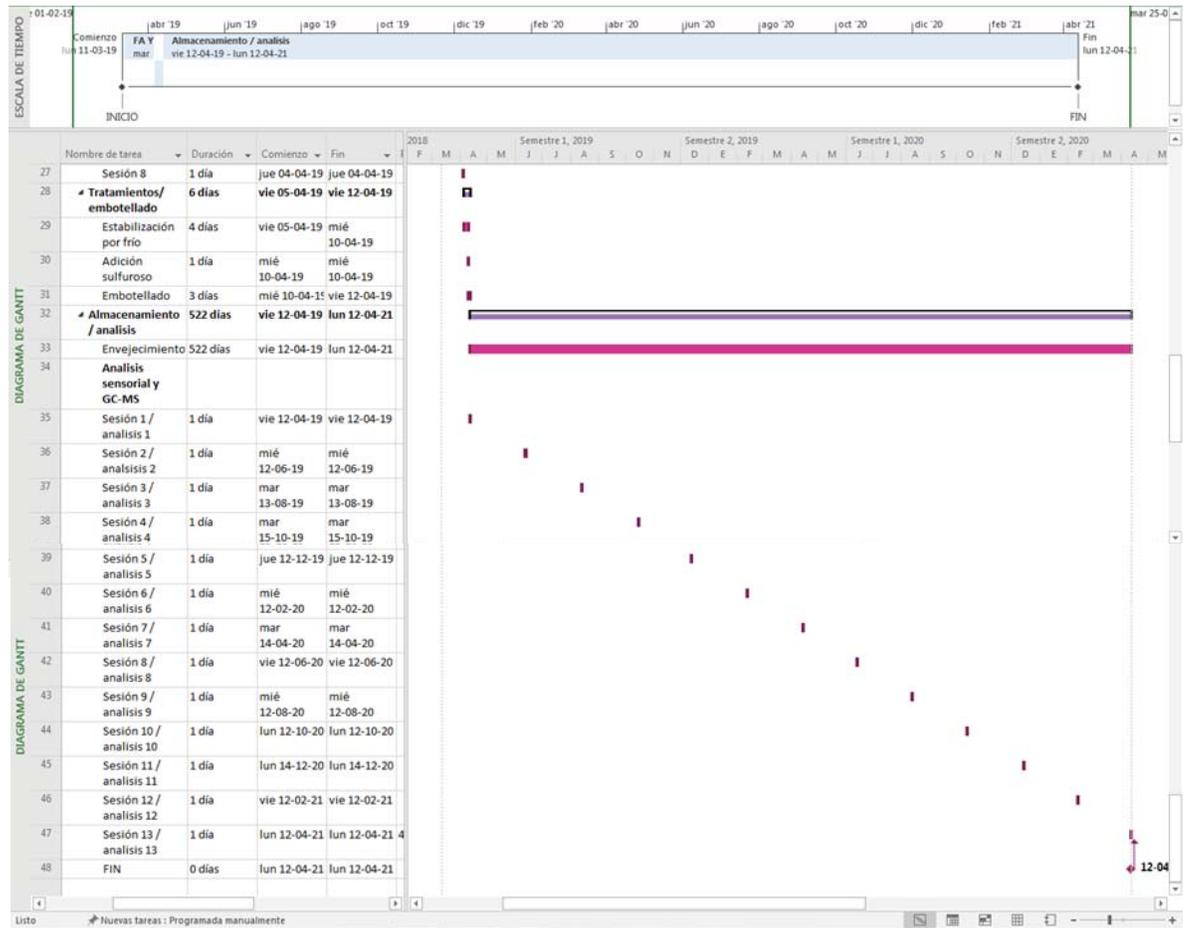
### Anexo 2.



Anexo 3.



anexo 4.



**anexos presupuesto****recursos humanos**

<b>Cargo en el Proyecto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Jornada hombre/mes</b>	<b>Precio jornada hombre</b>	<b>Cantidad de meses</b>	<b>Costo total</b>
Encargado y jefe proyecto	1	22	\$ 23.000	24	\$ 12.144.000
Ayudante de laboratorio	1	22	\$ 16.000	1	\$ 352.000
Obrero 1	1	22	\$ 12.000	1	\$ 264.000
Obrero 2	1	1	\$ 12.000	0,1	\$ 12.000
<b>Total</b>					<b>\$ 12.772.000</b>

**subcontratos**

<b>Contrato</b>	<b>Precio</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>total</b>
servicio de transporte	\$ 50.000	1	1	\$ 50.000
Análisis de laboratorio de baya (PUCV)	\$ 25.000	1	12	\$ 300.000
Análisis laboratorio de vino (PUCV)	\$ 25.000	1	12	\$ 300.000
GC-MS	\$ 20.000	1	144	\$ 2.880.000
<b>Total</b>				<b>\$ 3.530.000</b>

***inversión***

Ítem	Cantidad	Costo por Unidad	Costo total
Refractómetro	1	\$ 49.190	\$ 49.190
Botellas 750 ml	400	\$ 250	\$ 100.000
Bidón 25 L	12	\$ 8.930	\$ 107.160
Corchos	400	\$ 230	\$ 92.000
Incentivos (botellas de vino)	96	\$ 5.000	\$ 480.000
<b>Total</b>			<b>\$ 828.350</b>

***insumos***

Ítem	Unidades	Costo por Unidad	Cantidad	Total
Materia Prima (Uva)	Kg	\$ 210	400	\$ 84.000
Enoferm Syrah	500 g	\$ 43.770	1	\$ 43.770

Level 2 Biodiva	500 g	\$ 43.890	1	\$ 43.890
Level 2 Flavia	500 g	\$ 43.850	1	\$ 43.850
Bacteria láctica	250 g	\$ 90.000	1	\$ 90.000
Fermaid O	120 g	\$ 11.000	1	\$ 11.000
Etanol	Frasco 1 L	\$ 4.760	3	\$ 14.280
Agua destilada	Bidón de 5 L	\$ 5.000	4	\$ 20.000
Carbonato sódico 7,5%	Envase 1 kg	\$ 21.000	1	\$ 21.000
Metabisulfito de potasio	Envase ½ kg	\$ 5.560	1	\$ 5.560
Total				\$ 377.350

**materiales**

Ítem	Cantidad	Costo por unidad	Total
Guantes de látex sin polvo	1	\$ 8.693	\$ 8.693
Papel pH	1	\$ 8.553	\$ 8.553
Papel filtro 125 mm	1	\$ 10.158	\$ 10.158
Resmas hoja tamaño carta (500 hojas)	1	\$ 2.200	\$ 2.200
Lápiz	10	\$ 200	\$ 2.000
Block de notas	2	\$ 2.300	\$ 4.600
cuaderno	5	\$ 1500	\$ 7.500
Gamelas 30 kg	14	\$ 3.000	\$ 42.000
Copas	80	\$ 1500	\$ 120.000
Escupideras	20	\$ 1000	\$ 20.000
Tijeras de poda	3	\$ 25.000	\$ 75.000
<b>Total</b>			<b>\$ 300.704</b>

## gastos operacionales

Ítem	Cantidad	Costo por unidad	Costo total
<b>Fenoles totales</b>	144	\$ 8.178	\$ 1.177.632
<b>Taninos totales</b>	144	\$ 8.178	\$ 1.177.632
<b>Antocianos totales</b>	144	\$ 8.178	\$ 1.177.632
<b>Color</b>	144	\$ 5.252	\$ 756.288
<b>Análisis sensorial</b>	144	\$ 136.300	\$ 19.627.200

<b>Total</b>			<b>\$ 23.916.384</b>
--------------	--	--	----------------------

### Capacitación

Item	Cantidad	Costo por unidad	Costo total
Vinos	100	\$ 5.000	\$ 500.000
<b>Total</b>			<b>\$ 500.000</b>

### Costos totales

Ítem	Costo Total
Recursos Humanos	\$ 12.772.000
Subcontratos	\$ 3.530.000
Inversión	\$ 828.350
Insumos	\$ 377.350
Materiales	\$ 300.704
Gastos de operación	\$ 23.916.384
Capacitación	\$ 500.000
<b>Total</b>	<b>\$ 42.224.788</b>